



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/52, C12P 19/42	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/43421 (43) Date de publication internationale: 20 novembre 1997 (20.11.97)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00793</p> <p>(22) Date de dépôt international: 5 mai 1997 (05.05.97)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 96/05896 13 mai 1996 (13.05.96) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BLANCHE, Francis [FR/FR]; 41, rue des Solitaires, F-75019 Paris (FR). CAMERON, Béatrice [FR/FR]; 6, rue Tournefort, F-75005 Paris (FR). CROUZET, Joël [FR/FR]; 12, rue Michel Voisin, F-92330 Sceaux (FR). DEBUSSCHE, Laurent [FR/FR]; 112, avenue Jean Jaurès, F-91200 Athis Mons (FR). THIBAUT, Denis [FR/FR]; 28, rue Jean Colly, F-75013 Paris (FR). REMY, Elisabeth [FR/FR]; 38 bis, boulevard Saint Marcel, F-75005 Paris (FR).</p> <p>(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>	
<p>(54) Title: BIOSYNTHESIS METHOD ENABLING THE PREPARATION OF COBALAMINS</p> <p>(54) Titre: PROCEDE DE BIOSYNTHESE PERMETTANT LA PREPARATION DE COBALAMINES</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention features a biosynthesis method enabling the preparation of cobalamins. More precisely it features a method of increasing cobalamin production and more particularly of the coenzyme B₁₂ by recombinant DNA techniques and/or by the addition of a new cobalamin precursor.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne un procédé de biosynthèse permettant la préparation de cobalamines. Elle concerne plus précisément un procédé d'amplification de la production de cobalamines et plus particulièrement du coenzyme B₁₂ par les techniques d'ADN recombinant et/ou par ajout d'un nouveau précurseur de cobalamine.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PROCEDE DE BIOSYNTHESE PERMETTANT LA PREPARATION DE
COBALAMINES

La présente invention concerne un procédé de biosynthèse permettant la préparation de cobalamines. Elle concerne plus précisément un procédé d'amplification de la production de cobalamines et plus particulièrement du coenzyme B₁₂ par les techniques d'ADN recombinant et/ou par ajout d'un nouveau précurseur de cobalamines. La présente invention concerne enfin un procédé de préparation de souches recombinantes utiles dans le procédé de préparation de cobalamines selon la présente invention.

La vitamine B₁₂ fait partie d'une classe de molécules appelées cobalamines dont la structure est présentée notamment dans WO91/11518.

Les cobalamines sont synthétisées presque exclusivement par des bactéries selon un processus complexe également décrit dans WO91/11518. Au niveau industriel, en raison de la grande complexité des mécanismes de biosynthèse, la production de cobalamines et en particulier de la vitamine B₁₂ est principalement réalisée par des cultures en grand volume de bactéries Pseudomonas denitrificans, Propionobacterium shermanii et Propionobacterium freudenreichii.

Il est largement connu que les cobalamines sont synthétisées par certains microorganismes à partir des substrats suivants : l'acide aminolaevulinique, la S-adénosyl-L-méthionine, le cobalt, la glutamine, le R1-amino-2-propanol et le 5,6-diméthylbenzimidazole.

Parmi les précurseurs précédemment cités, le 5,6-diméthylbenzimidazole est synthétisé par les microorganismes producteurs de cobalamines. Deux voies de biosynthèse semblent exister pour le 5,6-diméthylbenzimidazole : l'une est caractéristique des microorganismes aérobies et fait intervenir l'oxygène moléculaire, l'autre est utilisée par les microorganismes anaérobies. Seul un gène intervenant dans la voie anaérobie a été isolé, il s'agit du gène cobT de *Salmonella thyphimurium* (Trzebiatowski et al., 1994). Aucun gène de synthèse du 5,6-diméthylbenzimidazole

n'a à ce jour été identifié chez les microorganismes aérobies. La quantité du 5,6-diméthylbenzimidazole synthétisé par les microorganismes est souvent limitante.

Par conséquent, le 5,6-diméthylbenzimidazole est préparé chimiquement et ajouté dans les milieux de production. La suppression de cet apport dans les milieux
5 présenterait donc un avantage certain.

Jusqu'à présent, aucun procédé de préparation industriel des cobalamines ne mentionne l'addition de précurseurs autres que le cobalt et le 5,6-diméthylbenzimidazole. Certaines souches ne produisant de cobalamines que sur des milieux contenant du R1-amino-2-propanol ont été récemment décrites (Crouzet et al.,
10 1990, Grabau et al., 1992). Le R1-amino-2-propanol pourrait donc être utilisé pour améliorer la production de cobalamines. Cependant, son usage pour une fermentation industrielle éventuelle est délicat et coûteux, car d'une part le R1-amino-2-propanol est un produit irritant et volatile, et d'autre part, il peut inhiber la croissance du microorganisme. Il serait donc particulièrement avantageux de trouver un autre
15 précurseur du résidu R1-amino-2-propanol des cobalamines ne présentant pas ces inconvénients. A cet égard, il est décrit une voie de biosynthèse du R1-amino-2-propanol à partir de la L-thréonine via l'aminocétone chez certains microorganismes. Mais, la L-thréonine ne permet cependant pas la complémentation des souches citées précédemment.

20 Plus généralement, pour améliorer la production des cobalamines il peut être avantageux d'augmenter la quantité de leurs précurseurs dans le milieu, en particulier s'ils sont limitants. Cette approche peut être réalisée soit en ajoutant directement le précurseur limitant ou un de ses dérivés ou analogues dans le milieu, soit en amplifiant la synthèse *in situ* de ce précurseur dans la souche productrice en utilisant les
25 techniques de génétique et en particulier la technologie de l'ADN recombinant.

La connaissance des voies de biosynthèse des cobalamines et de leurs précurseurs est à cet effet une étape clé pour améliorer la production des cobalamines.

Ainsi, la plupart des étapes de la voie de biosynthèse de la vitamine B12 ont été récemment caractérisées chez Pseudomonas denitrificans (Blanche et al., 1995). Pas moins de 22 gènes cob impliqués dans la biosynthèse des cobalamines ont été isolés et la fonction de la plupart des polypeptides codés par ces gènes a été identifiée.

5 D'autres gènes probablement impliqués dans la biosynthèse des cobalamines ou de leurs précurseurs ont été isolés chez d'autres microorganismes. Parfois la fonction de ces gènes n'est pas connue. Seule la détermination précise de leur rôle ou de leur effet permettrait de leur trouver une application. Ainsi chez une bactérie
10 photosynthétique facultative, Rhodobacter capsulatus, un fragment d'ADN portant au moins un gène nécessaire à la formation de l'appareil photosynthétique a été séquencé récemment (Pollich et al., 1993, Pollich et al., 1995a). Il a été suggéré que 5 des 8 gènes isolés sont des gènes de biosynthèse de cobalamines à cause de leur forte homologie avec 5 des 22 gènes cob de P. denitrificans décrits précédemment. Par
15 contre aucune fonction précise n'a pu être directement assignée aux 3 gènes restants, les gènes bluB, bluE et bluF. Les gènes bluB, bluE et bluF incluant leurs séquences promotrices, ont été séquencés et décrits dans Pollich et al., 1995a.

Selon la présente invention, on a découvert un nouveau précurseur de cobalamine. La présente invention a en effet permis d'obtenir une amélioration de production de cobalamine avec des milieux contenant de la O-phospho-L-thréonine.
20 Ce précurseur de cobalamines, non décrit jusqu'à ce jour, a un rôle comparable à celui d'un autre précurseur déjà connu, le R1-amino-2-propanol. Cependant, la O-phospho-L-thréonine possède l'avantage par rapport au R1-amino-2-propanol de ne pas être toxique et d'être un produit facilement manipulable. De plus, son efficacité pour l'amélioration de la production de cobalamines peut être plus de 1000 fois supérieure à
25 celle du R1-amino-2-propanol.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un fragment d'ADN de Rhodobacter capsulatus pour améliorer la production de cobalamines ou pour obtenir ou augmenter la synthèse in situ de O-phospho-L-thréonine ou de 5,6-diméthylbenzimidazole d'une cellule donnée.

La présente invention a permis d'obtenir une amélioration de la production de cobalamines avec des milieux ne contenant pas de R1-amino-2-propanol ou de O-phospho-L-thréonine en utilisant un fragment d'ADN portant notamment les gènes bluE et bluF de Rhodobacter capsulatus.

- 5 La présente invention a permis enfin d'obtenir une amélioration de la production de cobalamines sur des milieux ne contenant pas de 5,6-diméthylbenzimidazole en introduisant un fragment d'ADN portant notamment le gène bluB de Rhodobacter capsulatus.

- 10 La présente invention a pour objet, un procédé de biosynthèse de cobalamines par fermentation d'un microorganisme procaryote producteur de cobalamine, caractérisé en ce que :

- 15 - on utilise un microorganisme transformé par au moins un fragment d'ADN codant pour un enzyme impliqué dans une voie de biosynthèse de la O-phospho-L-thréonine et l'on cultive ledit microorganisme dans des conditions permettant l'expression dudit enzyme et la production de cobalamine ; et/ou

 - on ajoute dans le milieu de culture dudit microorganisme de la O-phospho-L-thréonine, ou

- 20 - on utilise un microorganisme aérobic transformé par au moins un fragment d'ADN codant pour un enzyme impliqué dans une voie de biosynthèse du 5,6 diméthylbenzimidazole et l'on cultive ledit microorganisme en aérobiose, dans des conditions permettant l'expression dudit enzyme et la production de cobalamine.

- 25 Le microorganisme peut contenir de façon endogène un gène tel que caractérisé ci-dessus. Dans ce cas, le procédé selon l'invention permet la surexpression de l'enzyme. Mais ledit microorganisme peut être également exempt de ce type de gène de manière endogène.

Par "fragment d'ADN codant pour un enzyme impliqué dans une voie de biosynthèse de la O-phospho-L-thréonine ou du 5,6 diméthylbenzimidazole", on entend que l'expression dudit fragment d'ADN se traduit par une synthèse de la O-phospho-L-thréonine ou du 5,6-diméthylbenzimidazole dans la cellule, suivie
5 éventuellement d'une libération dans le milieu de culture.

La culture peut se faire en batch ou bien en continu, et la purification des cobalamines peut se faire par les méthodes déjà utilisées au niveau industriel (Florent, 1986).

Dans un mode de réalisation on utilise un microorganisme transformé par un
10 fragment d'ADN codant pour un polypeptide impliqué dans une voie de biosynthèse de la O-phospho-L-thréonine comprenant les gènes bluE et bluF de Rhodobacter capsulatus, ou un fragment homologue ou s'hybridant avec lesdits gènes bluE et bluF et ayant la même fonction de coder pour un enzyme impliqué dans une voie de biosynthèse de la O-phospho-L-thréonine que lesdits gènes.

15 Dans un autre mode de réalisation, on utilise un microorganisme transformé par un fragment d'ADN codant pour un enzyme impliqué dans une voie de biosynthèse du 5,6-diméthylbenzimidazole comprenant le gène bluB de Rhodobacter capsulatus, ou un fragment homologue ou s'hybridant avec ledit gène bluB et ayant la même fonction de coder pour un enzyme impliqué dans une voie de biosynthèse du 5,6-
20 diméthylbenzimidazole que ledit gène.

L'invention implique l'utilisation d'un fragment d'ADN d'origine naturelle synthétique ou recombinante et homologue. Par fragment, on entend un fragment résultant de la dégénérescence du code génétique ou un fragment présentant une homologie de séquence d'au moins 25 % et qui code pour des polypeptides de même
25 fonction.

De façon appropriée, on utilise un microorganisme cultivé en aérobiose et ledit fragment d'ADN code pour un enzyme impliqué dans une voie de biosynthèse en aérobiose du 5,6-diméthylbenzimidazole.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation de souches recombinantes de microorganisme procaryote producteur de cobalamine, caractérisé en ce qu'on transforme ledit microorganisme par les techniques de génie génétique par au moins un fragment d'ADN codant pour un enzyme impliqué dans une
5 voie de biosynthèse de la O-phospho-L-thréonine ou du 5,6 diméthylbenzimidazole tel que défini ci-dessus.

La présente invention a également pour objet les souches recombinantes obtenues par le procédé de préparation de souches selon la présente invention.

La présente invention implique l'utilisation dans les procédés selon l'invention
10 d'un ADN recombinant contenant au moins une séquence d'ADN codant pour un dit polypeptide et dans lequel la ou lesdites séquences sont placées sous le contrôle de signaux d'expression.

A cet égard, on peut en particulier positionner en 5' de la séquence d'ADN des régions promotrices. De telles régions peuvent être homologues ou hétérologues de la
15 séquence d'ADN. En particulier, des promoteurs bactériens forts, tels que le promoteur de l'opéron tryptophane P_{trp} ou de l'opéron lactose P_{lac} de E.coli, le promoteur gauche ou droit du bactériophage lambda, les promoteurs forts de phages de bactéries, telles que les corynébactéries, les promoteurs fonctionnels chez les bactéries gram-négatives, tel que le promoteur P_{tac} de E.coli, le promoteur P_{xylS} des
20 gènes du catabolisme du xylène du plasmide TOL, le promoteur de l'amylase de Bacillus subtilis P_{amy}, pourront être utilisés. On peut citer également les promoteurs dérivés de gènes glycolytiques de levure, tels que les promoteurs des gènes codant pour le phosphoglycérate kinase, la glycéraldéhyde - 3 - phosphate déshydrogénase, la lactase ou l'énolase, qui pourront être utilisés lorsque l'ADN recombinant sera
25 introduit dans un hôte eucaryote. Un site de fixation des ribosomes sera également positionné en 5' de la séquence d'ADN et il pourra être homologue ou hétérologue, tel le site de fixation des ribosomes du gène cII du bactériophage lambda.

Des signaux nécessaires à la terminaison de la transcription pourront être placés en 3' de la séquence d'ADN.

L'ADN recombinant utilisé dans les procédés selon la présente invention peut ensuite être introduit directement dans une cellule hôte compatible avec les signaux d'expression choisis ou être cloné sur un vecteur plasmidique pour permettre
5 d'introduire de manière stable la séquence d'ADN en question dans la cellule hôte.

L'invention implique de façon connue l'utilisation des plasmides contenant une séquence d'ADN codant pour un dit polypeptide. De façon connue, ces plasmides contiennent aussi un système de répllication fonctionnel et un marqueur de sélection.

10 Différents types de vecteurs peuvent être utilisés. On préfère dans le cadre de l'invention utiliser des vecteurs de type RK2, c'est-à-dire de vecteurs ayant une origine de répllication RK2. On peut citer à titre d'exemple particulier, le vecteur RK2 (Saurugger et al., 1986), le vecteur pXL435 (Cameron et al., 1989), le vecteur pRK290 (US 4,590,163 ; Ditta et al., 1985) et le vecteur pXL1635 (WO 91/16439).
15 Un vecteur particulièrement avantageux est le vecteur pXL1635. D'autres vecteurs sont décrits dans la demande WO 91/16439.

Selon une variante de réalisation, on utilise un microorganisme transformé par un fragment d'ADN comprenant un fragment BamHI de 6,8 kb du plasmide pER1 (figure 1), décrit dans les exemples ci-après et qui code pour la synthèse des deux
20 précurseurs, O-phospho-L-thréonine et 5,6-diméthylbenzimidazole.

Dans un mode de réalisation plus particulièrement approprié pour l'expression d'un polypeptide impliqué dans la synthèse de la O-phospho-L-thréonine, on utilise un fragment d'ADN comprenant le fragment EcoRI/ClaI de 2,1 kb du plasmide pER2 (figure 2), décrit dans les exemples qui vont suivre.

25 Dans un mode de réalisation plus particulièrement approprié pour l'expression d'un polypeptide impliqué dans la synthèse de la O-phospho-L-thréonine, on utilise un

fragment d'ADN comprenant le fragment EcoRI/EcoRV de 1,6 kb du plasmide pER2 (figure 2) décrit dans les exemples qui vont suivre.

Dans un autre mode de réalisation, plus particulièrement approprié pour
5 l'expression d'un polypeptide impliqué dans la synthèse du 5,6-diméthylbenzimidazole, on utilise un fragment d'ADN comprenant le fragment BamHI de 6,8 kb du plasmide pER1, décrit dans les exemples qui vont suivre.

Les microorganismes procaryotes hôtes qui peuvent être utilisés selon
l'invention, sont plus particulièrement les bactéries du genre E.coli, Pseudomonas
10 denitrificans, Agrobacterium radiobacter, Agrobacterium tumefaciens, ou Rhizobium
meliloti ou encore Rhodobacter capsulatus. D'autres bactéries sont décrites dans
WO91/11518.

Toutefois, avantageusement on utilisera une bactérie P. denitrificans ou
A. radiobacter.

15 D'autres avantages et caractéristiques de la présente invention apparaîtront à la
lumière de la description détaillée qui va suivre.

Les exemples 1 et 2 décrivent comment il est possible d'obtenir une production
de cobalamines en ajoutant de la O-phospho-L-thréonine dans le milieu de culture
d'une souche de Pseudomonas denitrificans ou de Rhodobacter capsulatus. L'exemple
20 2 montre comment la O-phospho-L-thréonine peut remplacer avantageusement le R1-
amino-2-propanol dans les milieux de production, puisque des concentrations au moins
1000 fois plus importantes de R1-amino-2-propanol sont nécessaires pour obtenir une
production de cobalamines.

L'exemple 2 montre aussi que la région du chromosome de Rhodobacter
25 capsulatus portant les gènes bluE et bluF est impliquée dans la synthèse de la O-
phospho-L-thréonine. L'exemple 3 décrit la construction de plasmides portant les
gènes bluE et bluF à partir d'un fragment d'ADN de Rhodobacter capsulatus. Cet

exemple 3 montre surtout comment ces plasmides, une fois introduits dans des souches pour lesquelles la production de cobalamines est dépendante de l'addition de R1-amino-2-propanol ou de O-phospho-L-thréonine, permettent d'obtenir une production de cobalamines sur des milieux ne contenant pas de R1-amino-2-propanol ou de O-phospho-L-thréonine. L'exemple 4 montre que la région du chromosome de Rhodobacter capsulatus portant le gène bluB est impliquée dans la synthèse du 5,6 diméthylbenzimidazole.

Liste des figures :

Figure 1 : carte de restriction du plasmide pER1

10 Figure 2 : carte de restriction du plasmide pER2

Figure 3 : carte de restriction du plasmide pER3

Les figures 1 à 3 représentent les plasmides pER1, pER2 et pER3 respectivement.

1. Souches et plasmides

15 Les souches AH2 et BB1 de Rhodobacter capsulatus (Pollich et al., 1995a) ont été construites à partir de la souche 37b4 (DSM 938). La souche G2650 de Pseudomonas denitrificans a été construite à partir de la souche SBL 27 Rif^r par insertion du transposon Tn⁵ (Crouzet et al., 1990). Une souche G2650[Tet] a tout d'abord été construite en utilisant un transposon Tn⁵ portant le gène de résistance à la tétracycline. Puis une souche G2650[Sp] a été construite à partir de la souche
20 G2650[Tet] par échange du gène de résistance à la tétracycline du transposon Tn⁵ par un gène de résistance à la spectinomycine. La souche SBL 27 Rif^r dérive de la souche MB 580 (Brevet US, 3 018 225).

Le plasmide pBBW1 a été construit à partir d'un fragment d'ADN de
25 Rhodobacter capsulatus (Pollich et al., 1995a). Le plasmide pAHW25 (Pollich et Klug, 1995a) a été construit à partir du plasmide pBBW1

2. Techniques moléculaires

Les techniques générales de manipulation de l'ADN utilisent comme référence le manuel de laboratoire (Sambrook et coll., 1989).

Les enzymes sont utilisés comme le recommande le fabricant et proviennent
5 des laboratoires New England Biolabs et de Boehringer Mannheim.

Les techniques utilisées concernent essentiellement les étapes suivantes :

- digestion par des enzymes de restriction ;
- ligature de molécules d'ADN par la ligase du bactériophage T4.

3. Techniques de transformation

10 La transformation des souches d'E.coli est réalisée par électroporation (Dower et coll., 1988).

4. Techniques de conjugaison

Les conjugaisons entre la souche S17-1 d'E.coli et les différentes souches de P. denitrificans sont réalisées selon un protocole adapté de celui décrit par Simon et
15 ses collaborateurs (Simon et coll., 1986). La transformation des souches de *Pseudomonas* peut être réalisée par toute autre technique du génie génétique.

5. Préparation des milieux de production de cobalamines

Le milieu utilisé pour la production de cobalamines par les souches de P. denitrificans est le milieu PS4 décrit par Cameron et coll., 1989.

20 Le milieu utilisé pour la production de cobalamines par les souches de Rhodobacter capsulatus est le milieu RA décrit par Pollich, 1995b.

6. Dosage des cobalamines produites

La quantité de cobalamines produite est mesurée soit par dosage microbiologique soit par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

- Dosage microbiologique :

La quantité de cobalamines produite est mesurée par une méthode semi-quantitative utilisant la souche indicatrice 113-3 d'E.coli, auxotrophe pour la vitamine B12 (Davis et Mingioli, 1950).

Cette souche indicatrice est un mutant metE d'E.coli qui ne possède donc plus qu'une seule homocystéine méthyltransférase (EC 2.1.1.13) qui est B12-dépendante. Sur milieu minimum, elle ne requiert que la présence de vitamine B12 pour pousser.

Lorsque cette souche est incluse dans une surcouche de milieu minimum M9 (Miller, 1972) gélosé (auquel il ne manque que la vitamine B12 pour permettre la croissance de la souche), il est possible de doser la vitamine B12. En effet, si l'on dépose à la surface de la surcouche un échantillon d'une solution contenant de la vitamine B12, une auréole de croissance est visible à l'endroit du dépôt après 16 h d'incubation à 37°C. La vitamine B12 contenue dans l'échantillon diffuse et permet la croissance des bactéries incluses dans l'agar. Le diamètre de l'auréole de croissance est proportionnel à la concentration de B12 dans l'échantillon.

Les échantillons sont obtenus par lyse des cellules selon le protocole suivant :

0,1 ml d'une solution de (Tris-HCl pH=8 100 mM, EDTA 20 mM, saccharose 200g/l) contenant 24 mg/ml de lysozyme (Boehringer Mannheim) sont mélangés à 0,5 ml de culture cellulaire à doser. Après 30 min d'incubation à 37°C, 60 µl d'une solution de sodium dodécyl sulfate à 30 g/l sont rajoutés et le mélange est vortexé quelques secondes. 10 µl du lysat cellulaire obtenu, ou éventuellement une dilution au 1/50, sont déposés à la surface de la surcouche.

- Dosage par CLHP :

Les méthodes utilisées pour le dosage des cobalamines par chromatographie liquide à haute performance sont celles décrites par Blanche et coll., 1990.

EXEMPLE 1 : Effet de la O-phospho-L-thréonine sur la production de cobalamines par une souche de Pseudomonas denitrificans.

- 5 La souche G2650 [Tet] de Pseudomonas denitrificans est cultivée dans 25 ml de milieu PS4 contenant 2 µg/ml de tétracycline, en Erlenmeyer de 100 ml. Après 24 h de fermentation à 30°C sous agitation (250 rpm), 0,16 ou 0,32 ou 1,5 ml d'une solution de O-phospho-L-thréonine à 10 g/l, ce qui correspond à une concentration finale de 66, 132 et respectivement 600 mg/l, sont éventuellement ajoutés dans le milieu. Les quantités de
- 10 cobalamines produites dans chacune de ces conditions sont dosées par CLHP au bout de 148 h de fermentation. Les résultats (tableau 1) montrent que la souche G2650 [Tet] ne produit pas de vitamine B12 en milieu PS4. Par contre, la présence de O-phospho-L-thréonine dans le milieu, permet la production de B12 par cette même souche. La quantité de vitamine B12 produite est alors d'autant plus importante que la quantité de O-phospho-
- 15 L-thréonine rajoutée est importante.

TABLEAU 1

O-phospho-L-thréonine ajoutée dans le milieu (mg/l)	0	66	132	600	600 (ajoutée à t=0)
B12 (mg/l) produite	0	1,8	2,5	4,2	3,8

EXEMPLE 2 : Effets comparés de la O-phospho-L-thréonine et du R1-amino-2-propanol sur la production de cobalamines par une souche Rhodobacter capsulatus.

- 20 La souche AH2 de Rhodobacter capsulatus est cultivée en Erlenmeyer de 100 ml dans 70 ml de milieu RA en présence de 10 µg/ml de kanamycine et de différentes concentrations de O-phospho-L-thréonine et de R1-amino-2-propanol. Après 24 à 48 h de fermentation à 30°C sous agitation (100 rpm), la quantité de cobalamines produites dans les différentes conditions est mesurée par dosage microbiologique.

Les résultats sont montrés Tableau 2, dans lequel "-" signifie absence de halo de croissance de la souche indicatrice et "+", présence d'un halo de croissance d'un diamètre d'autant plus important qu'il y a de "+". Ces résultats montrent que la souche AH2 de *R. capsulatus*, cultivée en milieu RA ne produit pas de vitamine B12. Par contre, en présence de O-phospho-L-thréonine ou de R1-amino-2-propanol, cette souche est capable de produire de la vitamine B12. Les résultats montrent aussi qu'il faut rajouter de l'ordre 6.10^3 fois plus de R1-amino-2-propanol pour avoir le même résultat qu'avec la O-phospho-L-thréonine.

TABLEAU 2

Concentration de O-phospho-L- thréonine dans le milieu	10 nM	25 nM	50 nM	100 nM	250 nM
Production de B12	-	+	++	+++	++++

Concentration de R1-amino-2-propanol dans le milieu	6 μ M	30 μ M	150 μ M	1,2 mM
Production de B12	-	-	-	+

EXEMPLE 3 : Effet de la présence d'un fragment d'ADN dérivant du plasmide pBBW1 dans la souche G2650, non productrice de cobalamines.

3.1. Construction du plasmide pER1 (figure 1)

Le plasmide pER1 de 17,4 kb a été construit par clonage au site BamHI du vecteur pXL435 (Cameron et coll., 1989) du fragment d'ADN BamHI de 6,8 kb purifié à partir du plasmide pBBW1 (Pollich et Klug, 1995).

3.2. Introduction du plasmide pER1 dans la souche G2650 de *P. denitrificans*

Le plasmide pER1 a dans un premier temps été introduit par électroporation dans la souche S17-1 d'*E.coli* et, dans un deuxième temps, a été introduit dans la souche G2650 [Tet] de *P. denitrificans* par conjugaison avec la souche S17-1 d'*E.coli* contenant le plasmide pER1. Les transconjugants résistant à 50 µg/ml de rifampicine et à 100 µg/ml de lividomycine ont été sélectionnés. 9 clones analysés contenaient le plasmide pER1.

De la même façon, une souche témoin G2650 [Tet] contenant le vecteur pXL435 seul a été construite.

3.3. Production de cobalamines par la souche G2650 contenant le plasmide pER1.

Les clones G2650 [Tet] contenant le plasmide pER1 ainsi que 2 clones contenant le plasmide pXL435 ont été cultivés dans le milieu PS4 en présence de rifampicine, tétracycline et de lividomycine. Après 140 h de fermentation à 30°C sous agitation (250 rpm), la quantité de cobalamines produites a été mesurée par dosage microbiologique et par CLHP. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.

TABLEAU 3

		B12 dosage microbiologique	B12 CLHP (mg/l)
Souches G2650 [Tet] contenant le plasmide pER1	1	++	3
	2	++	3,5
	3	++	3,4
	4	++	3,2
	5	++	2,9
	6	++	3,9
	7	++	3,6
	8	++	3,3
	9	++	3,9
Souches G 2650 [Tet] contenant le	1	-	0
	2	-	0

plasmide pXL435			
Souche G2650 [Tet]		-	0

Alors que ni la souche G2650 [Tet] ni cette souche contenant le plasmide pXL435 ne produisent de vitamine B12 en milieu PS4, cette même souche contenant le plasmide pER1 est capable de produire de la B12 à une concentration de l'ordre de 3,5 mg/l. La souche G2650 [Tet] contenant le plasmide pXL435, c'est-à-dire
5 uniquement le vecteur de clonage qui a servi à la construction du plasmide pER1, ne produit pas de B12 : c'est donc la présence du fragment d'ADN de 6,8 kb dérivant du plasmide pBBW1 qui est responsable de la production de B12.

Ce fragment d'ADN BamHI de 6,8 kb purifié à partir du plasmide pBBW1 confère donc à la souche G2650 [Tet] de P. denitrificans la capacité de produire de la
10 vitamine B12 en milieu PS4.

3.4. Sous-clonages

Les régions du fragment d'ADN BamHI de 6,8 kb contenant les gènes bluE et bluF ont été sous clonées dans le vecteur de clonage pXL435, donnant naissance aux plasmides appelés pER2 et pER3, grâce à des constructions intermédiaires.

15 Le plasmide pER2 de 12,9 kb (figure 2) contient le fragment EcoRI/ClaI de 2,1 kb purifié à partir du plasmide pBBW1 et cloné dans le vecteur pXL435. Ce fragment d'ADN a préalablement été cloné aux sites EcoRI/ClaI du plasmide pBluescript II SK+ (Stratagene) puis a été purifié à partir de ce plasmide recombinant sous forme d'un fragment d'ADN BamHI/SalI pour le clonage dans le vecteur
20 pXL435.

Le plasmide pER3 de 11,9 kb (figure 3) contient le fragment PstI de 1,2 kb purifié à partir du plasmide pBBW1 et cloné dans le vecteur pXL435. Il a été préalablement cloné au site PstI du plasmide pBluescript II SK+ puis a été purifié à

partir de ce plasmide recombinant sous forme d'un fragment de restriction BamHI/Sall pour le clonage dans le vecteur pXL435.

Le plasmide pAHW25 (Pollich et Klug, 1995a) contient le fragment EcoRI/EcoRV de 1,6 kb purifié à partir du plasmide pBBW1 et cloné dans le vecteur pRK415 (Keen et al., 1988) : le gène bluE est alors transcrit à partir du promoteur lac du vecteur.

Les plasmides pER2 ou pER3 ont été introduits dans la souche G2650 [Tet] de P. denitrificans par conjugaison avec la souche S17-1 d'E. coli contenant ces mêmes plasmides. Les clones de G2650 [Tet] contenant les plasmides pER2, pER3 ou pXL435 ont été cultivés dans 5 ml de milieu PS4 en présence de rifampicine, tétracycline et lividomycine. Les plasmides pAHW25 et pRK415 ont été introduits dans la souche G2650[Sp] de P. denitrificans par conjugaison avec la souche S17-1 d'E. coli contenant ces mêmes plasmides. Les clones des souches G2650[Sp] contenant les plasmides pAHW25 ou pRK415 ont été cultivés dans 25 ml de milieu PS4, en présence de rifampicine, lividomycine et spectinomycine. Après 140h de fermentation à 30°C sous agitation (250 rpm), la quantité de cobalamines produites est mesurée par dosage microbiologique et par CLHP.

Les résultats, présentés dans le tableau 4, montrent que seuls les clones des souches G2650 contenant les plasmides pER2 ou pAHW25 sont capables de produire de la vitamine B12 en milieu PS4.

TABLEAU 4

		B12 dosage microbiologique	B12 en CLHP (mg/l)
Souche G2650[Tet]		-	0
Souche G2650[Sp]		-	0
Souches G2650[Tet] contenant le plasmide pXL435	1	-	0
	2	-	0
	3	-	0
Souches G2650[Tet] contenant le plasmide pER2	1	++	7,4
	2	++	5,3
	3	++	7,9
	4	++	3,5
	5	++	5,2
	6	++	6,8
	7	++	7,2
Souches G2650[Tet] contenant le plasmide pER3	1	-	0
	2	-	0
	3	-	0
	4	-	0
	5	-	0
	6	-	0
	7	-	0
	8	-	0
Souches G2650[Sp] contenant le plasmide pRK415	1	-	0
	2	-	0
	3	-	0
	4	-	0
Souches G2650[Sp] contenant le	1	++	3,0
	2	++	2,2
	3	++	3,0
	4	++	2,9

plasmide pAHW25	5	++	2,9
	6	++	3,3
	7	++	3,1
	8	++	2,4

EXEMPLE 4 : Le gène *bluB* est impliqué dans la biosynthèse du 5,6-diméthylbenzimidazole (DBI), un précurseur connu de la B12.

La souche BB1 de *Rhodobacter capsulatus* est une souche mutante qui a été obtenue par insertion d'un interposon dans le gène *bluB* : c'est une souche *bluB*⁻ (Pollich et coll., 1995). La souche BB1 est cultivée dans 70 ml de milieu RA en Erlenmeyer de 100 ml en présence de 10 µg/ml de kanamycine et de différentes concentrations de DBI. Les quantités de cobalamines produites par cette souche dans les différentes conditions sont mesurées par dosage microbiologique après 24 à 48 h de fermentation à 30°C sous agitation (100 rpm). Les résultats, résumés dans le Tableau 5, montrent que la souche mutante BB1, non productrice de B12 en milieu RA seul, synthétise cette molécule lorsqu'au moins 14 nM de DBI sont présents dans le milieu. Le gène *bluB* est donc impliqué dans de la biosynthèse du 5,6-diméthylbenzimidazole.

TABLEAU 5

concentration de DBI dans le milieu nM	0	7	14	35	70	140	350
production de B12	-	-	+	++	+++	++++	+++++

REFERENCES

1. Davis B.D. et E. Mingioli (1950), *J. Bacteriol.* 60 : 17-28
2. Dower W. J., J.F. Miller et C. W. Ragsdale (1988) *Nucl. Acids Res.* 16 : 6127-6145 Ref M9
- 5 3. Sambrook J., E.F. Fritsch et T. Maniatis (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*, second edition
4. Simon R., M. O'Connell, M. Labes et A. Pühler (1986) *Meth. In Enzymology* 118 : 640-659
- 10 5. Blanche F., D. Thibaut, M. Couder, et J.C. Muller (1990), *Anal. Biochem.*, 189 : 24-29
6. Blanche F., B. Cameron, J. Crouzet, L. Debussche, D. Thibaut, M. Vuilhorgne, F.J. Leeper, et A. R. Battersby (1995) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 34 : 383-411
- 15 7. Cameron B., K. Briggs, S. Pridmore, G. Brefort, et J. Crouzet (1989) *J. Bacteriol.*, 171 : 547-557
8. Crouzet J., L. Cauchois, F. Blanche, L. Debussche, D. Thibaut, M.C. Rouyez, S. Rigault, J.F. Mayaux, et B. Cameron (1990) *J. Bacteriol.*, 172 : 5968-5979
9. Grabau C., et J. R. Roth (1992) *J. Bacteriol.*, 174 : 2138-2144
- 20 10. Pollich M., S. Jock, et G. Klug (1993) *Mol. Microbiol.*, 10 : 749-757
11. Pollich M., et G. Klug (1995a) *J. Bacteriol.*, 177 : 4481-4487
12. Pollich M. (1995b) *Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg*

13. Florent J., (1986), Vitamins, Biotechnology, vol. 4, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, In H. -J. Rehm and G. Reed (ed.), 115-158
14. Ditta G., Schmidhauser T., Yakobson E., Lu P., Liang X. W., Finlay D.R., Guiney D., et Helinski D., (1985), Plasmid, 13: 149-154.
- 5 15. Miller J. H., (1972), Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor, N.Y.
16. Saurugger P.N., Hrabak O., Schwab H., et Lafferty R.N., (1986). J. Biotechnol. 4 : 333-343
- 10 17. Keen N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi et D. Trollinger (1988) Gene 70 : 191-197

REVENDICATIONS.

1. Procédé de biosynthèse de cobalamines par fermentation d'un microorganisme procaryote producteur de cobalamine, caractérisé en ce que :

5 - on utilise un microorganisme transformé par au moins un fragment d'ADN codant pour un enzyme impliqué dans une voie de biosynthèse de la O-phospho-L-thréonine et l'on cultive ledit microorganisme dans des conditions permettant l'expression dudit enzyme et la production de cobalamine ; et/ou

 - on ajoute dans le milieu de culture dudit microorganisme de la O-phospho-L-thréonine ; ou

10 - on utilise un microorganisme aérobique transformé par au moins un fragment d'ADN codant pour un enzyme impliqué dans une voie de biosynthèse du 5,6 diméthylbenzimidazole et l'on cultive ledit microorganisme en aérobiose, dans des conditions permettant l'expression dudit enzyme et la production de cobalamine.

15 2. Procédé selon la revendication 1 dans lequel on utilise un microorganisme transformé par un fragment d'ADN codant pour un polypeptide impliqué dans une voie de biosynthèse de la O-phospho-L-thréonine comprenant les gènes bluE et bluF de Rhodobacter capsulatus, ou un fragment homologue et/ou s'hybridant avec lesdits gènes bluE et bluF et ayant la fonction de coder pour un enzyme impliqué dans une voie de biosynthèse de la O-phospho-L-thréonine.

20 3. Procédé selon la revendication 1 dans lequel on utilise un microorganisme transformé par un fragment d'ADN codant pour un enzyme impliqué dans une voie de biosynthèse du 5,6-diméthylbenzimidazole comprenant le gène bluB de Rhodobacter capsulatus, ou un fragment homologue et/ou s'hybridant avec ledit gène bluB et ayant la même fonction de coder pour un enzyme impliqué dans une voie de biosynthèse du
25 5,6-diméthylbenzimidazole que ledit gène.

4. Procédé selon l'une des revendications 2 à 3, caractérisé en ce que ledit fragment d'ADN comprend un fragment BamHI de 6,8 kb du plasmide pER1.

5. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ledit fragment d'ADN comprend le fragment EcoRI/ClaI de 2,1 kb du plasmide pER2.

6. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ledit fragment d'ADN comprend le fragment EcoRI/EcoRV de 1,6 kb du plasmide pAHW25 ou du plasmide
5 pER2.

7. Procédé de préparation de la vitamine B12 selon l'une des revendications 1 à 5.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que ledit microorganisme est une souche de Pseudomonas denitrificans ou de Agrobacterium radiobacter.

10 9. Procédé de préparation de souches recombinantes de microorganisme procaryote producteur de cobalamine, caractérisé en ce qu'on transforme ledit microorganisme par les techniques de génie génétique par au moins un fragment d'ADN codant pour un enzyme impliqué dans une voie de biosynthèse de la O-phospho-L-thréonine ou du 5,6 diméthylbenzimidazole tel que défini dans les
15 revendications 1 à 6.

10. Microorganisme recombinant obtenu par le procédé selon la revendication 9.

11. Microorganisme selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une souche de Pseudomonas denitrificans ou Agrobacterium radiobacter.

1/3

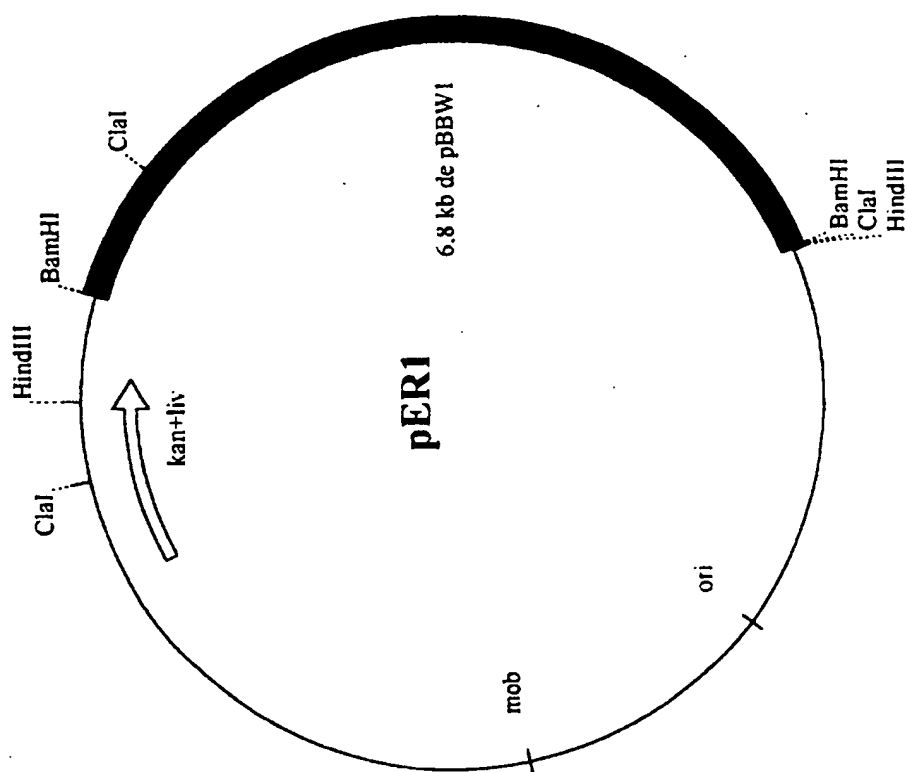


Figure 1

2/3

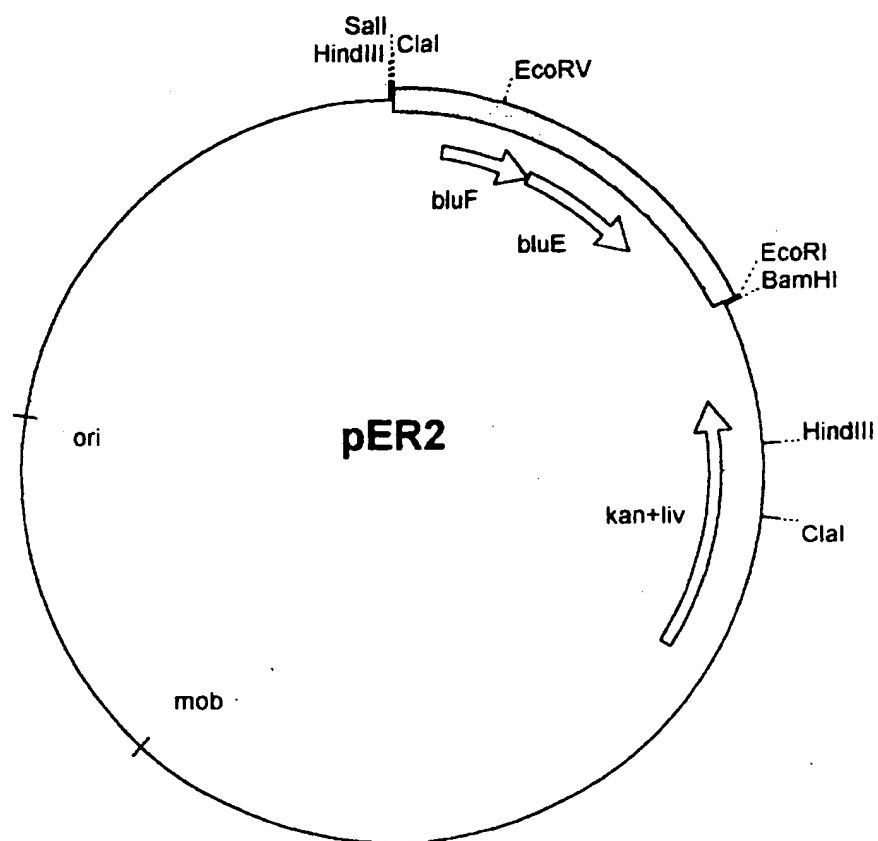


Figure 2

3/3

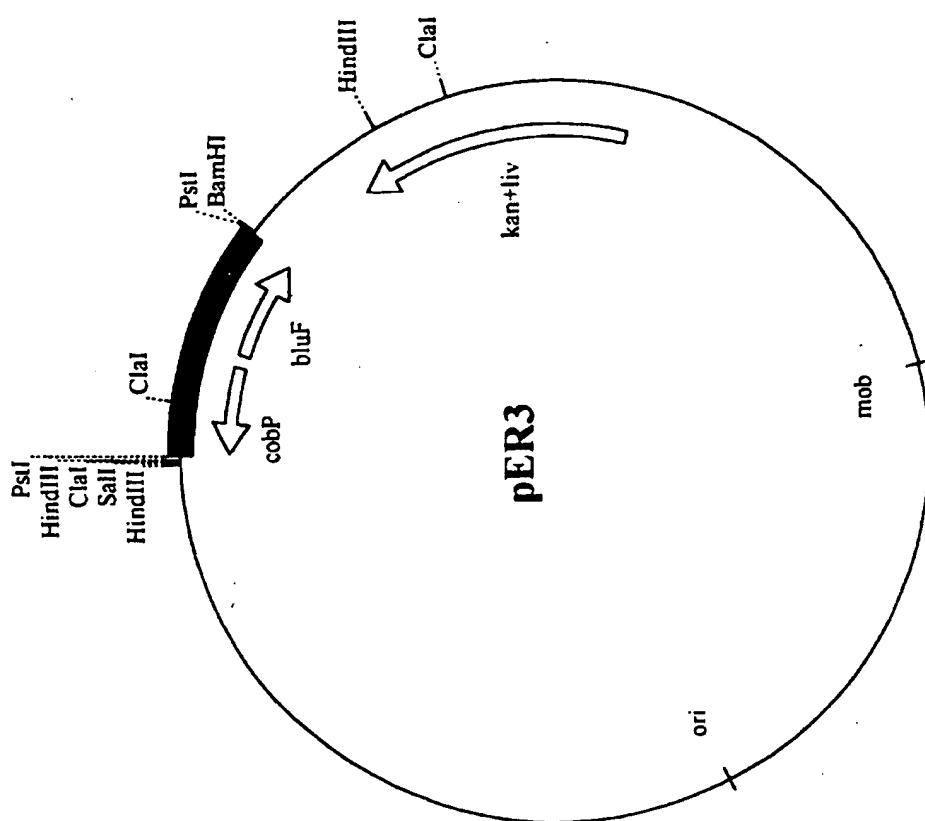


Figure 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.
PCT/FR 97/00793

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/52 C12P19/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. BACTERIOL. (1995), 177(15), 4481-7 CODEN: JOBAAY;ISSN: 0021-9193, XP000616401 POLLICH, MICHAEL ET AL: "Identification and sequence analysis of genes involved in late steps of cobalamin (vitamin B12) synthesis in Rhodobacter capsulatus" cited in the application see the whole document ---	1
A	J. GEN. APPL. MICROBIOL. (1986), 32(4), 351-9 CODEN: JGAMA9;ISSN: 0022-1260, XP000616396 NOPARATNARAPORN, NAPAVERN ET AL: "Selection of Rhodobacter sphaeroides P47 as a useful source of single cell protein" see the whole document --- -/--	1



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 August 1997

Date of mailing of the international search report

26.08.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Delanghe, L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. Application No
PCT/FR 97/00793

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 91 11518 A (RHONE POULENC BIOCHIMIE) 8 August 1991 cited in the application see claims ---	1
A	EP 0 462 892 A (RAMBACH ALAIN) 27 December 1991 see claims ---	1
A	EP 0 647 717 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 12 April 1995 see claims -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/00793

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9111518 A	08-08-91	FR 2657622 A	02-08-91
		CA 2072023 A	01-08-91
		CN 1054799 A	25-09-91
		EP 0516647 A	09-12-92

EP 0462892 A	27-12-91	FR 2663646 A	27-12-91

EP 0647717 A	12-04-95	CN 1106018 A	02-08-95
		JP 7163387 A	27-06-95
		US 5545538 A	13-08-96
		US 5538888 A	23-07-96

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 97/00793

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/52 C12P19/42		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12P C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications vistes
A	J. BACTERIOL. (1995), 177(15), 4481-7 CODEN: JOBAAY; ISSN: 0021-9193, XP000616401 POLLICH, MICHAEL ET AL: "Identification and sequence analysis of genes involved in late steps of cobalamin (vitamin B12) synthesis in Rhodobacter capsulatus" cité dans la demande voir le document en entier ---	1
A	J. GEN. APPL. MICROBIOL. (1986), 32(4), 351-9 CODEN: JGAMA9; ISSN: 0022-1260, XP000616396 NOPARATNARAPORN, NAPAVERN ET AL: "Selection of Rhodobacter sphaeroides P47 as a useful source of single cell protein" voir le document en entier --- -/--	1
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 13 août 1997		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 26.08.97
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patenilaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Delanghe, L

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 97/00793

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 91 11518 A (RHONE POULENC BIOCHIMIE) 8 août 1991 cité dans la demande voir revendications ---	1
A	EP 0 462 892 A (RAMBACH ALAIN) 27 décembre 1991 voir revendications ---	1
A	EP 0 647 717 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 12 avril 1995 voir revendications -----	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 97/00793

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9111518 A	08-08-91	FR 2657622 A	02-08-91
		CA 2072023 A	01-08-91
		CN 1054799 A	25-09-91
		EP 0516647 A	09-12-92

EP 0462892 A	27-12-91	FR 2663646 A	27-12-91

EP 0647717 A	12-04-95	CN 1106018 A	02-08-95
		JP 7163387 A	27-06-95
		US 5545538 A	13-08-96
		US 5538888 A	23-07-96

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.